(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0057497
(43) 공개일자 2018년05월30일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 35/50 (2015.01) *A61K 9/14* (2006.01)
A61K 9/20 (2006.01) *A61K 9/48* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 35/50 (2013.01)
A61K 9/14 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-0098596
(22) 출원일자 2017년08월03일
심사청구일자 2017년08월03일
(30) 우선권주장
1020160155184 2016년11월21일 대한민국(KR)

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
송재준
서울특별시 서초구 신반포로 9, 73동 504호 (반포본동, 주공아파트)
고윤영
서울특별시 구로구 구로동로 148, 이빈인후과 (구로동, 고려대부속구로병원)
(74) 대리인
특허법인 무한

전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 발명의 명칭 **중이염 치료를 위한 양막추출물 또는 융모막추출물을 포함하는 조성물**

(57) 요 약

본 발명은, 양막추출물, 융모막 추출물 또는 이들의 혼합물을 유효성분으로 포함하는 약학적 조성물에 관한 것으로서, 본 발명의 조성물은 중금속에 의하여 유발되는 염증 반응 관련 유전자의 발현을 억제하고, 세포사멸 반응을 억제하므로, 중금속에 의하여 유발되는 이비인후과영역의 삼출성/만성 중이염 질환과 그 외에도, 중금속에 의해 발생하는 다양한 질환에 대하여 예방 또는 치료 효과를 기대할 수 있다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61K 9/20 (2013.01)
A61K 9/48 (2013.01)
Y10S 514/956 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 HI15C2835
부처명 보건복지부
연구관리전문기관 한국보건산업진흥원
연구사업명 첨단의료기술개발
연구과제명 Dual kill switch를 탑재한 골재생용 세포치료제 개발
기 여 율 1/1
주관기관 고려대학교 산학협력단
연구기간 2016.12.01 ~ 2017.11.30

명 세 서

청구범위

청구항 1

융모막(chorion membrane) 및 상피세포층을 포함하는 양막(amnion membrane) 중 하나 이상의 막 추출물을 유효성분으로 포함하는, 중이염의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 중이염은 중금속에 의하여 유발되는, 중이염의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 중금속은 구리, 니켈, 아연, 납, 카드뮴, 수은, 비소 및 크롬으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상인, 중이염의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 조성물은 TNF-α, COX-2, MUC5AC, AQP-4, 및 TP53으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자 발현을 감소시키는, 중이염의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 조성물은 ENaC-α, ENaC-β, 및 ENaC-γ로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자 발현을 증가시키는, 중이염의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 조성물은 중금속에 의하여 유발되는 중이 상피세포(middle ear epithelial cell)의 세포자살(apoptosis) 반응을 감소시키는, 중이염의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 막 추출물의 농도가 100㎍/㎖ 내지 200㎍/㎖인, 중이염의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 8

제1항에 있어서,

항염증제 또는 약학적으로 허용 가능한 담체를 더 포함하는, 중이염의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 9

제1항에 있어서,

산제, 과립제, 정제, 캡술제, 현탁액, 에멀젼, 시럽, 에어로졸, 외용제, 좌제 또는 멸균 주사용 액으로 제형화된, 중이염의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 10

태반으로부터 융모막 및 상피세포층을 포함하는 양막 중 하나 이상의 막을 분리하는 단계;

상기 분리된 막을 항생제가 첨가된 인산완충식염수(PBS, Phosphate Buffer Saline) 또는 생리식염수로 세척하는 단계;

상기 세척된 막을 분쇄하는 단계;

상기 분쇄된 막 및 완충용액을 혼합하고, 8시간 내지 24시간 동안 추출하는 단계; 및

추출물의 상층액을 수집 및 여과하여 막 추출물을 수득하는 단계;를 포함하는, 중이염의 예방 또는 치료용 약학적 조성물의 제조방법.

청구항 11

제9항에 있어서,

상기 조성물은 TNF-α, COX-2, MUC5AC, AQP-4 및 TP53으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자 발현을 감소시키는, 중이염의 예방 또는 치료용 약학적 조성물의 제조방법.

청구항 12

제9항에 있어서,

상기 조성물은 ENaC-α, ENaC-β, 및 ENaC-γ로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자 발현을 증가시키는, 중이염의 예방 또는 치료용 약학적 조성물의 제조방법.

청구항 13

제9항에 있어서,

상기 조성물은 중금속에 의하여 유발되는 중이 상피세포의 세포자살 반응을 감소시키는, 중이염의 예방 또는 치료용 약학적 조성물의 제조방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 양막 추출물, 융모막 추출물 또는 이들의 혼합물을 유효성분으로 포함하는, 중이염의 예방 또는 치료를 위한 약학적 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 납(lead)은 위험성이 알려지면서 그 사용이 줄었으나 취급의 편리, 우수한 방부력 그리고 가격이 저렴하여 여전히 일상적인 환경에 존재하는 중금속이다. 어른들의 경우는 주로 직업이나 취미활동에 의해서 납에 노출되지만, 특히 6세 이하의 아이들은 손에서 입으로 이어지는 행동이 많아 납이 포함되거나 오염된 음식이나 물건들을 입에 갖다 대거나 씹는 경우가 많이 발생하여 납이 체내로 유입되기 쉽다. 또한 납에 오염된 토양과 음료로부터 납 중독 발생이 나타난다. Sammy zahran의 2011년 논문을 보면 미국 뉴올리언즈 지역에서 토양의 납 농도 증가에 따라 아이들의 혈액 속 납 농도가 농축되어 증가되는 것을 확인할 수 있다 (S. Zahran et al.,Science of The Total Environment 409 (2011) 1211-1218). 체내로 들어온 납은 중추 신경과 발달 장애 등을 가져오며 계속되는 납의 중독은 생명의 위험이 된다. 이러한 해로운 영향은 대부분 납에 의해 발생된 ROS(reactive oxygen species)로 부터 유발된 산화 자극(oxidative stress)이 그 원인으로 알려져 있다[G. Souid et al., Drug and Chemical Toxicology 01-8, C. Sousa et al., Applied Microbiology and Biotechnology 98 (2014) 5153-5160 and R. Pouresmaeil et al., Renal Failure 34 (2012) 1114-1117]. Ghada Souid의 논문에서는 물고기에 2시간, 4시간 그리고 24시간으로 나누어 0.75mg/L의 납을 노출시킨 다음 조직 별로 납의 농축을 확인 한 후 간 조직에서 산화과정에서 발생하는 부산물, GSH (Gluthathion)와 AChE (Acethylcholenesterase activity)를 바이오마커로 사용하여 납이 산화 자극을 발생시키는 물질임을 밝혔다. GSH는 간과 세포에서 프리라디컬(free radical)을 제거하여 세포 손상을 방지하고, 각종 독성물질을 제거하는 역할을 하는 단백질로 수중 생물에서 산화 자극이 나타날 때 사용하는 지표(바이오마커)로 사용된다. 또한, AChE는 신경 독성물질로 물고기의 중금속 농축에 따른 신경 장애를 측정할 때 사용되는 바이오마커이다. 이 논문에서 납 노출에 따라 GSH와 AChE 모두 대조군에 비하여 증가되는 것을 확인하여 납이 산화 자극을 일으키는 물질임을 입증하였다 [G. Souid et al., Drug and Chemical Toxicology 01-8].

[0004] 중이염은 세균이나 바이러스 등이 중이에 침입하여 염증을 일으키는 질환으로 현재까지 알려진 중이염의 발병원인으로는 크게 염증 반응과 산화 작용으로 알려져 있다[J.D. Li, A. Hermansson et al., Otolaryngology Head and Neck Surgery 148 (2013) E52-E63 and T.G. Takoudes et al., Otolaryngology Head and Neck Surgery 120 (1999) 638-642].

[0005] 최근에 환경적인 인자들이 중이염을 발병하게 하는 원인으로 나타나고 있다. 선행 연구에서는 도시의 미세먼지나 담배 연기가 인간 중이 점막 상피세포에서 점액 유전자 및 염증 유전자의 발현을 증가시킨다는 자료가 제시되었으며, 특히 담배 연기에 의해 발생된 산화 자극이 중이 점막 상피세포에서 염증을 일으킬 수 있는 요인이라는 점이 밝혀졌다. [G.J. Im et al.,International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology 78 (2014) 777-781, J.G. Cho et al., International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology 73 (2009) 1447-1451, J.J. Song et al., Int J Pediatr Otorhinolaryngol 77 (2013) 1760-1764 and J.J. Song et al., International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology 76 (2012) 334-338]. 담배 연기에는 많은 발암물질과 함께 중금속인 카드뮴과 납도 포함되어 있는바, 중금속, 특히, 납에 의하여 중이염이 발생될 가능성이 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 목적은, 중금속에 의하여 유발되는 중이염을 효과적으로 예방 또는 치료할 수 있는 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0008] 그러나, 본 발명이 해결하고자 하는 과제는 이상에서 언급한 과제로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 해당 기술분야의 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0010] 일실시예에 따르면, 융모막(chorion membrane) 및 상피세포층을 포함하는 양막(amnion membrane) 중 하나 이상의 막 추출물을 유효성분으로 포함하는, 중이염의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0011] 일측에 따르면, 상기 중이염은 중금속에 의하여 유발될 수 있다.

[0012] 일측에 따르면, 상기 중급속은 구리, 니켈, 아연, 납, 카드뮴, 수은, 비소 및 크롬으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있다.

[0013] 일측에 따르면, 상기 조성물은 TNF-α, COX-2, MUC5AC, AQP-4 및 TP53으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자 발현을 감소시킬 수 있다.

[0014] 일측에 따르면, 상기 조성물은 ENaC-α, ENaC-β 및 ENaC-γ로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자 발현을 증가시킬 수 있다.

[0015] 일측에 따르면, 상기 조성물은 중금속에 의하여 유발되는 중이 상피세포의 세포자살(apoptosis) 반응을 감소시킬 수 있다.

[0016] 일측에 따르면, 상기 막 추출물의 농도가 100㎍/㎖ 내지 200㎍/㎖일 수 있다.

[0017] 일측에 따르면, 상기 조성물은 항염증제 또는 약학적으로 허용 가능한 담체를 더 포함할 수 있다.

[0018] 일측에 따르면, 상기 조성물은 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀젼, 시럽, 에어로졸, 외용제, 좌제 또는 멸균 주사용 액으로 제형화될 수 있다.

[0019] 일실시예에 따르면, 태반으로부터 융모막 및상피세포층을 포함하는 양막 중 하나 이상의 막을 분리하는 단계, 상기 분리된 막을 항생제가 첨가된 인산완충식염수(PBS, Phosphate Buffer Saline) 또는 생리식염수로 세척하는 단계, 상기 세척된 막을 분쇄하는 단계, 상기 분쇄된 막 및 완충용액을 혼합하고, 8시간 내지 24시간 동안 추출하는 단계 및 추출물의 상층액을 수집 및 여과하여 막 추출물을 수득하는 단계를 포함하는, 중이염의 예방 또는 치료용 약학적 조성물의 제조방법을 제공한다.

[0020] 일측에 따르면, 상기 조성물은 TNF-α, COX-2, MUC5AC, AQP-4, 및 TP53으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자 발현을 감소시킬 수 있다.

[0021] 일측에 따르면, 상기 조성물은 ENaC-α, ENaC-β 및 ENaC-γ로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자 발현을 증가시킬 수 있다.

[0022] 일측에 따르면, 상기 조성물은 중금속에 의하여 유발되는 중이 상피세포의 세포자살 반응을 감소시킬 수 있다.

발명의 효과

[0024] 본 발명의 약학적 조성물은 양막 추출물, 융모막 추출물 또는 이들의 혼합물을 유효성분으로 포함하여, 중금속인 납(Pb)에 의하여 유발되는 염증 반응 관련 유전자의 발현을 조절하고 세포 사멸 반응을 억제하므로, 중이염의 예방 및 치료에 효과가 있다. 따라서 본 발명의 조성물은, 이비인후과영역의 삼출성/만성 중이염 질환과 그 외에 중금속에 의해 발생하는 만성 염증성 질환, 예컨대 동맥경화, 당뇨, 천식, 고혈압, 관절염, 대장염, 간염에도 예방 또는 치료 효과를 기대할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0026] 도 1은, 태반에서 분리한 양막, 융모막, 양막/융모막 복합체 및 양막 추출물과 융모막 추출물을 나타낸 사진이다.

도 2는, 납 농도에 따른 중이 상피세포를 관찰한 사진이다.

도 3은, 납 농도에 따른 중이 상피세포 생존도를 분석한 그래프이다.

도 4는, 납의 농도에 따른 중이 상피세포의 세포자살(apoptosis) 반응을 관찰한 사진이다.

도 5는, 납이 처리된 인간 중이 상피세포에 대하여 막 추출물 처리 후의 세포 사진을 나타낸 것이다.

도 6은 중금속 처리에 따른 중이염 관련 유전자의 발현 정도를 나타낸 그래프이다.

도 7은 중금속 처리에 따른 중이염 관련 유전자의 발현 정도를 나타낸 그래프이다.

도 8은, 막 추출물 처리에 따른 중이염 관련 유전자의 발현 정도를 나타낸 그래프이다.

도 9는, 막 추출물 처리에 따른 중이염 관련 유전자의 발현 정도를 나타낸 그래프이다.

도 10은, 각각의 실험군에서 중이 상피세포의 세포자살 반응을 관찰한 사진이다.

도 11은, 각각의 실험군에서 중이 상피세포의 세포자살 반응 정도를 나타낸 그래프이다.

도 12는, 막 추출물 처리에 따른 세포 생존율을 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0027] 이하에서, 첨부된 도면을 참조하여 실시예들을 상세하게 설명한다. 각 도면에 제시된 동일한 참조 부호는 동일한 부재를 나타낸다.

[0028] 아래 설명하는 실시예들에는 다양한 변경이 가해질 수 있다. 아래 설명하는 실시예들은 실시 형태에 대해 한정하려는 것이 아니며, 이들에 대한 모든 변경, 균등물 내지 대체물을 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

[0029] 실시예에서 사용한 용어는 단지 특정한 실시예를 설명하기 위해 사용된 것으로, 실시예를 한정하려는 의도가 아니다. 단수의 표현은 문맥상 명백하게 다르게 뜻하지 않는 한, 복수의 표현을 포함한다. 본 명세서에서, "포함하다" 또는 "가지다" 등의 용어는 명세서 상에 기재된 특징, 숫자, 단계, 동작, 구성 요소, 부품 또는 이들을 조합한 것이 존재함을 지정하려는 것이지, 하나 또는 그 이상의 다른 특징들이나 숫자, 단계, 동작, 구성 요소, 부품 또는 이들을 조합한 것들의 존재 또는 부가 가능성을 미리 배제하지 않는 것으로 이해되어야 한다.

[0030] 다르게 정의되지 않는 한, 기술적이거나 과학적인 용어를 포함해서 여기서 사용되는 모든 용어들은 실시예가 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가지고 있다. 일반적으로 사용되는 사전에 정의되어 있는 것과 같은 용어들은 관련 기술의 문맥 상 가지는 의미와 일치하는 의미를 가지는 것으로 해석되어야 하며, 본 출원에서 명백하게 정의하지 않는 한, 이상적이거나 과도하게 형식적인 의미로 해석되지 않는다.

[0031] 또한, 첨부 도면을 참조하여 설명함에 있어, 도면 부호에 관계없이 동일한 구성 요소는 동일한 참조 부호를 부여하고 이에 대한 중복되는 설명은 생략하기로 한다. 실시예를 설명함에 있어서 관련된 공지 기술에 대한 구체적인 설명이 실시예의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우 그 상세한 설명을 생략한다.

[0033] 일실시예에 따르면, 융모막(chorion membrane) 및 상피세포층을 포함하는 양막(amnion membrane) 중 하나 이상의 막 추출물을 유효성분으로 포함하는, 중이염의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0034] 상기 막 추출물은 양막 추출물 또는 융모막 추출물일 수 있고, 이들의 혼합물일 수도 있다. 이 때, 혼합물은 상기 양막 추출물과 융모막 추출물을 독립적으로 추출한 후 혼합한 것일 수 있고, 이와 달리 상기 양막/융모막 복합체로부터 추출한 것일 수도 있다.

[0035] 본 발명의 용어 "양막(amnion membrane)"은 태반을 구성하고 있는 가장 안쪽에 있는 막으로, 양수와 태아를 둘러싸고 있어 외부의 병원균으로부터 태아를 보호하고 양수와 태아의 생체항상성을 유지하여, 태아가 정상적으로 성장/발달 할 수 있는 환경을 조성하는 역할을 한다.

[0036] 상기 양막은 표피세포 성장인자(epidermal growth factor, EGF), 섬유아세포 성장인자(fibroblast growth factor, FGF), 전환 성장인자(transforming growth factor, TGF-b), 신경 성장인자(nerve growth factor, NGF) 및 간장 성장인자(hepatic growth factor, HGF)등을 포함한다. 또한, 콜라겐으로 구성된 세포외 기질과 상피세포로 구성되어 있으며 항염증(anti-inflammation), 항균(anti-bacterial) 성분을 포함하고 있으며 혈관생성 조절 성분(angiogenic modulatory properties)들이 있다.

[0037] 또한, 상기 양막은 그람-음성과 그람-양성의 박테리아 종, 곰팡이, 및 바이러스에 대하여 항박테리아성을 갖는 베타-디펜신(β-defensin), 칼프로텍틴(Calprotectin; MRP8/14), 유비퀴틴(Ubiquitin) 및 항박테리아/투과성 증가 단백질(Bactericidal/permeability-increasing protein: BPI)을 포함한다. 특히, BPI는 그람-음성균과 지질다당체(lipopolysaccharide)에 대항하는 숙주 방어의 중요한 요소로서, 원내 감염 혹은 인공호흡기 관련 감염에 중요한 역할을 한다.

[0038] 본 발명의 용어 "융모막(chorion membrane)"은 상기 양막과 맞붙어 있는 막으로서, 불투명하며 망상세포층, 기

저층, 영양배엽세포층으로 이루어진 두꺼운 막을 지칭한다.

[0039] 종래에는, 양막을 생체막의 형태로 사용하고자 하는 경우, 그 자체의 활용이 제한적이며 다양한 신체부위에의 적용에 어려움이 있었다. 특히, 양막이 포함하고 있는 상피세포층을 제거하지 않으면 염증 반응으로 인한 부작용이 발생할 수 있다는 문제점이 있었다. 또한, 종래에는 융모막이 제거된 양막을 사용하는 것이 일반적이었는데, 이는 융모막에 포함된 콜라겐층과 세포층으로 인한 부작용을 방지하기 위한 것이었다.

[0040] 그러나, 양막의 상피세포층과 융모막에는 다양한 성장인자뿐 아니라 항균성 물질들이 다량 포함되어 있으므로, 본 발명자들은 상피세포층을 제거하지 않은 양막과 함께 융모막을 이용하여 이들의 단독 또는 혼합 추출물을 제조하였으며, 상기 추출물의 중이염의 예방 또는 치료 효과를 규명하였다.

[0041] 한편, 상기 중이염은 중금속에 의하여 유발될 수 있다. 구체적으로, 상기 중금속은 구리, 니켈, 아연, 납, 카드뮴, 수은, 비소, 또는 크롬과 같은 중금속일 수 있으나, 이에 한정되지 않으며, 바람직하게는 납일 수 있다.

[0042] 일측에 따르면, 상기 조성물은 중이염 관련 유전자인 TNF-α(Tumor Necrosis Factor α), COX-2(Cyclooxygenase 2), MUC5AC(Mucin 5AC), AQP-4(Aquaporin 4), 및 TP53(Tumor Protein p53)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자 발현을 감소시킬 수 있다.

[0043] 또한, 상기 조성물은 ENaC-α(Epithelial Na^+ Channel α), ENaC-β(Epithelial Na^+ Channel β) 및 ENaC-γ(Epithelial Na^+ Channel γ)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자 발현을 증가시킬 수 있다.

[0044] 본 명세서의 실시예 5의 방법으로, 중이염 관련 유전자의 발현을 관찰한 결과, 중이염 반응에 관련된 유전자 TNF-α, COX-2, MUC5AC, AQP-4, 및 TP53의 발현은 모두 중금속(예시: 납)에 의해 모두 급격히 증가하는 반면, 중금속이 처리된 중이 상피세포에 대하여 양막 추출물, 융모막 추출물 또는 이들의 혼합물이 처리된 경우에는, 상기 중이염 관련 유전자들의 발현이 모두 감소되었으며, 각 유전자의 발현 정도는 중금속이 처리되지 않은 정상 세포와 유사한 수준인 것을 확인할 수 있었다.

[0045] 또한, ENaC-α, ENaC-β 및 ENaC-γ는 모두 중이 점막 상피에서 소듐(Na^+) 채널을 통한 수분 흡수 조절에 관여하는 유전자로, 외부에서 들어오는 소리를 내이로 효과적으로 전달하기 위해 중이강을 수분이 없는 상태로 유지한다. 이에 대해, 중이 점막 상피세포에서의 염증 반응은 이러한 ENaC 계열의 유전자 발현을 억제한다.

[0046] 본 발명자들은, 중금속(예시: 납)이 처리된 중이 상피세포에서 상기 ENaC 계열 유전자의 발현이 모두 감소하는 반면, 양막 추출물 및/또는 융모막 추출물이 처리된 경우에는 상기 ENaC 계열 유전자의 발현이 증가하여, 일부 유전자의 경우 추출물 농도에 따라 중금속 처리 전과 비교하여도 다소 향상된 발현 수준을 나타낼 수 있음을 확인하였다. 이는 상기 막 추출물이 중금속에 의하여 유발된 중이염의 치료 효과를 나타냄을 의미할 수 있다.

[0047] 일측에 따르면, 상기 조성물은 중금속에 의하여 유발되는 중이 상피세포(middle ear epithelial cell)의 세포자살(apoptosis) 반응을 감소시킬 수 있다.

[0048] 중금속(예시: 납)의 농도가 증가할수록 중이 상피세포에서는 세포자살 반응이 증가하여, 세포 생존도가 감소하는 것을 확인하였다(실시예 3 참조). 그러나, 본 명세서의 실시예 6과 같은 방법으로, 상기 막 추출물이 세포자살 반응에 미치는 효과를 관찰한 결과, 중금속이 고농도로 처리된 중이 상피세포라 하더라도, 상기 막 추출물이 함께 처리된 경우에는 세포자살 반응이 억제되는 것을 확인할 수 있었다.

[0049] 일측에 따르면, 상기 막 추출물의 농도가 100㎍/㎖ 내지 200㎍/㎖일 수 있다.

[0050] 상기 약학적 조성물은 상기 막 추출물 뿐만 아니라, 항염증제와 같은 공지의 유효성분을 1종 이상 더 함유할 수 있다.

[0051] 또한, 상기약학적 조성물은 약학적으로 허용가능한 담체를 추가적으로 포함할 수 있다.

[0052] 본 발명에서의 용어 "약학적으로 허용가능한 담체"는 임의의 대상 조성물 또는 성분을 하나의 기관, 또는 신체의 부분으로부터 다른 기관, 또는 신체의 부분으로의 운반 또는 수송하는 것에 관여하는 액체 또는 고체 충전제, 희석제, 부형제, 용매 또는 캡슐화 물질과 같은 제약상 허용가능한 물질, 조성물 또는 비히클을 지칭하며, 본 발명의 조성물은 투여를 위해서 상기 기재한 유효성분 이외에 약학적으로 허용가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 더 포함할 수 있다.

[0053] 상기 담체, 부형제 및 희석제로는 락토오스, 덱스트로오스, 수크로오스, 소르비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리

톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로오스, 메틸 셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 스테아린산 마그네슘 및 광물유를 들 수 있다.

[0054] 또한, 상기 약학적 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀젼, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 또는 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용할 수 있다. 상세하게는 제형화할 경우 통상 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다.

[0055] 경구투여를 위한 고형제제로는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 이러한 고형제제는 상기 막 추출물에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 칼슘 카보네이트, 수크로오스, 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 스테아린산 마그네슘, 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등을 포함하나, 이에 한정되지 않으며, 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등을 첨가하여 조제될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제는 멸균된 수용액, 비수성 용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제 및 좌제를 포함한다. 비수성 용제 및 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 오일, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔, 마크로골, 트윈 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.

[0056] 한편, 상기 약학적 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비경구 투여(예를 들어, 정맥 내, 피하, 복강 내 또는 국소에 적용)할 수 있으며, 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 필요에 따라 일일 1회 내지 수회로 나누어 투여할 수 있으며, 병원성 세균 및 내성균에 대한 예방 또는 치료를 위하여 단독으로, 또는 수술, 호르몬 치료, 약물 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.

[0057] 또 다른 하나의 양태로서, 본 발명의 일실시예는 융모막 및 양막 중 하나 이상의 막 추출물을 유효성분으로 포함하는 의약외품 조성물을 제공한다. 즉, 본 발명의 일실시예는 중이염의 예방 또는 개선을 목적으로 하는 의약외품 조성물을 제공할 수 있다. 이 때, 상기 양막은 전술한 것과 같이 상피세포층을 포함할 수 있다.

[0058] 상기 의약외품 조성물은 다른 의약외품 또는 의약외품 성분과 함께 사용할 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효성분의 혼합량은 사용 목적(예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다.

[0059] 상기 의약외품 조성물은 소독청결제, 샤워폼, 가그린, 물티슈, 세제비누, 핸드워시, 가습기 충진제, 마스크, 연고제 또는 필터충진제 일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0061] 일실시예에 따르면, 태반으로부터 융모막 및 상피세포층을 포함하는 양막 중 하나 이상의 막을 분리하는 단계, 상기 분리된 막을 항생제가 첨가된 인산완충식염수(PBS, Phosphate Buffer Saline) 또는 생리식염수로 세척하는 단계, 상기 세척된 막을 분쇄하는 단계, 상기 분쇄된 막로 및 완충용액을 혼합하고, 8시간 내지 24시간 동안 추출하는 단계 및 추출물의 상층액을 수집 및 여과하여 막 추출물을 수득하는 단계를 포함하는, 중이염의 예방 또는 치료용 약학적 조성물의 제조방법을 제공한다. 이 때, 상기 중이염은 중금속에 의하여 유발되는 것일 수 있다. 구체적인 중금속의 종류는 전술한 것과 같다.

[0062] 일측에 따르면, 상기 조성물은 중이염 관련 유전자인 TNF-α, COX-2, MUC5AC, AQP-4, 및 TP53으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자 발현을 감소시킬 수 있다.

[0063] 일측에 따르면, 상기 조성물은 ENaC-α, ENaC-β 및 ENaC-γ로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자 발현을 증가시킬 수 있다.

[0064] 일측에 따르면, 상기 조성물은 중금속에 의하여 유발되는 중이 상피세포의 세포자살 반응을 감소시킬 수 있다.

[0065] 종래에는 양막을 생체막의 형태 또는 분쇄물로 사용하고자 하는 경우, 염증반응으로 인한 부작용 또는 콜라겐층과 세포 층으로 인한 부작용을 방지하고자, 양막의 상피세포층과 융모막을 제거하는 단계를 포함하였다. 그러나, 양막의 상피세포층과 융모막에는 다양한 성장인자뿐 아니라 항균성 물질들이 다량 포함되어 있으므로, 본 발명자들은 상피세포층을 제거하지 않은 양막 뿐만 아니라 융모막을 단독 또는 혼합 사용하여 추출물을 제조하

였다.

[0067] **실시예 1: 양막추출물 및 융모막추출물 제조**

[0068] 태반의 탯줄을 중심으로 칼집을 내어 양막을 태반으로부터 조심스럽게 박리하여 채취하였다. 채취한 양막을 1% 페니실린/스트렙토마이신 항생제가 첨가된 PBS 또는 생리식염수로 세척하였다. 양막의 점액질과 혈액을 제거한 후 균질기(homogenizer)를 이용하여 분쇄시키고 양막에 대하여 1:1의 중량비로 완충용액 PBS를 넣고 하룻밤 동안 4℃에 방치하여 단백질이 방출되도록 하였다. 초음파 분쇄기를 이용하여 단백질 방출을 보조한 후, 원심분리기를 이용하여 추출물의 상층액을 수집하고 여과멸균(syringe filter)하여 -80℃에 보관하였다. 양막 추출물은 단백질의 농도를 측정하여 실험에 사용하였다. 동일한 방법을 사용하여, 융모막 추출물을 제조하였다. 도 1은, 태반에서 분리한 양막, 융모막, 양막/융모막 복합체 및 양막 추출물과 융모막 추출물을 나타낸 사진이다.

[0070] **실시예 2: 중금속에 의한 인간 중이 상피세포의 세포 감소와 생존도 분석**

[0071] 중이 상피세포는 정상 중이 점막 상피세포에 인간 유두종 바이러스의 E6과 E7 유전자를 삽입하여 불멸화한 세포주(House Ear Institute, Los Angeles, CA, USA)를 사용하였다. 상기 세포주는, 세포의 형태가 모세포와 같고 동물에 주입하여도 종양을 발생시키지 않으므로, 정상 중이 점막 상피세포의 생물 기능을 평가할 수 있는 세포주로 사용될 수 있다.

[0072] 상기 중이 상피세포에 납(Ⅱ) 아세테이트 트리하이드레이트(lead(Ⅱ) acetate trihydrate)를 96-웰 플레이트에 각각 0, 50, 100, 200, 400 및 600㎛M 처리하여 24시간 동안 노출시킨 후 세포의 모습을 관찰하였으며, 대조군으로는 납이 처리되지 않은 인간 중이 상피세포를 사용하여 세포의 모습을 비교하였다.

[0073] 납 처리 후, 96-웰 플레이트에서 각각의 세포들을 CCK-8 키트(Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japan)를 이용하여 납 농도와 시간에 따른 세포 생존도를 분석하였다. 구체적으로, 배양액을 제거하고 PBS 용액으로 2번 세척한 후, CCK-8의 농도가 10%가 되도록 만든 배양액을 각각의 웰에 넣었다. 1시간 동안 37℃에서 반응시킨 후 세포의 탈수소효소의 활성도에 의한 포르마잔(formazan) 염료 발색을 측정하였다. 염료 발색은 분광 광도계에서 450㎚의 파장으로 흡광도를 측정하였으며, 각 실험은 독립적으로 3회 반복 실행하여 평균 값을 구하였다.

[0074] 도 2는, 납 농도에 따른 중이 상피세포를 관찰한 사진이다.

[0075] 도 3은, 납 농도에 따른 중이 상피세포 생존도를 분석한 그래프이다.

[0076] 도 2 및 도 3을 참고하면, 납의 농도가 증가할수록, 중이 상피세포의 수가 감소하고, 생존도가 감소하는 것을 확인할 수 있었다.

[0078] **실시예 3: 중금속에 의한 인간 중이 상피세포의 세포자살(apoptosis) 증가 분석**

[0079] 실시예 2에서와 같은 방법으로 준비된, 중이 상피세포에 납(Ⅱ) 아세테이트 트리하이드레이트(lead(Ⅱ) acetate trihydrate)를 96-웰 플레이트에 각각 0, 0.5, 50, 100, 200, 400, 600 및 800㎛M 처리하여 24시간 동안 노출시켰다. Caspase-3/7 Reagent (Essen bioscience)를 1 : 1000으로 희석하여 5㎛M로 만든 후 각각의 웰에 50㎕씩 넣어준 후 2 내지 3시간 간격으로 incucyte에서 apoptosis가 발생한 세포내로 들어간 Caspase-3/7의 발색을 실시간으로 관찰하였다. 대조군으로는 납이 처리되지 않은 인간 중이 상피세포를 사용하여 세포의 모습을 비교하였다

[0080] 도 4는, 납의 농도에 따른 중이 상피세포의 세포자살 반응을 관찰한 사진이다. 도 4를 참고하면, 납의 농도가 증가할수록 세포자살 반응이 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

[0082] **실시예 4: 중금속 처리된 인간 중이 상피세포에 대한, 양막 추출물 또는 융모막 추출물의 세포 수 증가 효과**

[0083] 실시예 2에서와 같은 방법으로 준비된, 중이 상피세포에 납(Ⅱ) 아세테이트 트리하이드레이트(lead(Ⅱ) acetate trihydrate)를 6-웰 플레이트에 각각, 600㎛M로 처리한 실험군을 준비하였다. 각각의 웰에 양막 추출물 또는 융모막 추출물을 100㎍/㎖ 또는 200㎍/㎖ 처리한 후, 24 시간 동안 노출시키고 세포의 모습을 관찰하였다. 대

조군으로는 납은 처리되었으나 양막 추출물 또는 융모막 추출물은 처리되지 않은 인간 중이 상피세포와, 아무것도 처리되지 않은 인간 중이 상피세포를 사용하여 세포의 모습을 비교하였다

[0084] 도 5는, 납이 처리된 인간 중이 상피세포에 대하여 양막 추출물 또는 융모막추출물을 처리한 후의 세포 사진을 나타낸 것이다.

[0085] 도 5를 참고하면, 납만 처리한 군에서는 세포들이 바닥에서 떨어지거나 사멸하여 보이지 않는 면적이 크게 관찰되었으나, 양막 추출물 또는 융모막 추출물을 처리한 군에서는 납과 함께 응집되어 세포를 보호하는 모습이 관찰되었다. 또한 양막 추출물 또는 융모막 추출물의 농도가 높을수록 살아있는 정상 세포의 모습이 더 많이 관찰되었다.

[0087] **실시예 5: 중금속 처리된 인간 중이 상피세포에 대한, 양막 추출물 또는 융모막 추출물의 염증 반응 억제 효과**

[0088] 실시예 2에서와 같은 방법으로 준비된, 중이 상피세포에 납(Ⅱ) 아세테이트 트리하이드레이트(lead(Ⅱ) acetate trihydrate)를 96-웰 플레이트에 각각 0, 50, 100, 200, 400, 600μM로 처리한 후, 24 시간 동안 노출시켜 세포를 배양하였다.

[0089] 배양된 중이 상피세포로부터 Trizol을 이용하여 RNA를 추출하고, cDNA synthesis kit(TaKaRa, Bio Inc, Japan)를 이용하여 cDNA 를 합성하였다. 정량적 중합효소연쇄반응은 ABI Prism 7300 Real-time PCR system(Applied Biosystems, Foster City, CA)을 이용하였으며, 반응 혼합물의 구성은 10㎕의 2x SYBR Green Master Mix, 5pmol의 각 sense 와 antisense 프로브(probe), 그리고 1㎕의 cDNA로 최종 20㎕를 맞추어 사용하였다. 중합효소연쇄반응은 45회 반복하였다. 각 실험은 독립적으로 3회 반복 실행하여 평균 값을 구하였다.

[0090] 도 6 및 도 7은, 중금속 처리에 따른 중이염 관련 유전자의 발현 정도를 나타낸 그래프이다.

[0091] 도 6 및 도 7을 참고하면, 중이염 반응에 관련된 유전자 TNF-α, COX-2, MUC5AC, 및 AQP-4의 발현은 모두 납에 의해 농도 의존적으로 증가하고, ENaC-α, ENaC-β, 및 ENaC-γ의 발현은 농도 의존적으로 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 이를 통해, 납이 중이염의 염증 반응을 유도한다는 것을 알 수 있다.

[0092] 또한, 실시예 2에서와 같은 방법으로 준비된, 중이 상피세포에 납(Ⅱ) 아세테이트 트리하이드레이트(lead(Ⅱ) acetate trihydrate)를 6-웰 플레이트에 각각 60μM로 처리한 뒤, 양막 추출물, 융모막 추출물 또는 이들의 혼합물을 각각 100㎍/㎕, 200㎍/㎕ 처리하고 24시간 동안 노출시켜 세포를 배양하였다. 이후, 전술한 것과 동일한 방법으로 각 유전자의 발현 수준을 측정하였다.

[0093] 도 8 및 9는, 막 추출물 처리에 따른 중이염 관련 유전자의 발현 정도를 나타낸 그래프이다.

[0094] 도 8 및 9를 참고하면, 납이 처리된 중이 상피세포에 대하여 양막 추출물(AME, A), 융모막 추출물(CME, C) 또는 이들의 혼합물(AC)이 처리된 경우, TNF-α, COX-2, MUC5AC, AQP-4, 및 TP53과 같은 중이염 관련 유전자들의 발현이 모두 감소되었으며, 각 유전자의 발현 정도는 납이 처리되지 않은 정상 세포와 유사한 수준인 것을 확인하였다.

[0095] 또한, 납 처리에 의해 감소된 ENaC 계열의 유전자 발현 수준이 양막 추출물, 융모막 추출물 또는 이들의 혼합물을 처리함에 따라 증가하였고, 경우에 따라서는 납 처리 이전보다 증가한 발현 수준을 나타내는 것을 확인하였다.

[0097] **실시예 6: 중금속 처리된 인간 중이 상피세포에 대한, 양막 추출물 또는 융모막 추출물의 세포자살(apoptosis) 억제 효과**

[0098] 실시예 2에서와 같은 방법으로 준비된 중이 상피 세포를 96-웰 플레이트에 넣고, 납(Ⅱ) 아세테이트 트리하이드레이트(lead(Ⅱ) acetate trihydrate)만 100μM로 처리한 군, 양막 추출물만 100㎍/㎖ 처리한 군, 융모막 추출물만 100㎍/㎖ 처리한 군, 납(Ⅱ) 아세테이트 트리하이드레이트 100μM와 양막 추출물 100㎍/㎖ 처리한 군, 납(Ⅱ) 아세테이트 트리하이드레이트 100μM와 융모막 추출물 100㎍/㎖ 처리한 군을 준비하였다. 24 시간 동안 배양한 후, Caspase-3/7 Reagent(Essen bioscience)를 1 : 1000으로 희석하여 5μM로 만든 후 각각의 웰에 50㎕씩 넣어주고 2 내지 3시간 간격으로 incucyte에서 세포자살(apoptosis)이 발생한 세포 내의 Caspase-3/7의 발색을 실시간으로 관찰하였다.

[0099] 도 10은, 각각의 실험군에서 중이 상피세포의 세포자살 반응을 관찰한 사진이고, 도 11은 동일한 결과를 그래프로 나타낸 것이다.

[0100] 도 10 및 11을 참고하면, 고농도의 납이 처리된 경우 ROS(reactive oxygen species)가 발생하여 세포자살 반응(Oxidative stress damage)이 활발하게 일어나는 반면, 고농도의 납이 처리되더라도 양막 추출물 또는 융모막 추출물이 처리된 경우에서는 세포자살 반응이 억제되는 것을 확인할 수 있었다.

[0101] 이와 같은 결과를 통해, 중금속에 의한 독성 메커니즘 중 하나인 Oxidative stress damage에 의한 염증 발생에서 양막 추출물과 융모막 추출물이 ROS 발생을 억제하여 중이내 염증을 억제하는 것을 알 수 있다.

[0103] **실시예 7: 양막 추출물, 융모막 추출물의 세포독성 분석**

[0104] 상기 실시예 2와 동일한 방법으로 양막 추출물, 융모막 추출물 및 이들의 혼합물의 세포독성을 측정하였다. 이때, 각 추출물의 농도를 100㎍/㎖, 200㎍/㎖로 달리하여 측정하였다.

[0105] 도 12는 막 추출물 처리에 따른 세포 생존율(%)을 나타낸 그래프이다.

[0106] 도 12를 참고하면, 양막 추출물(A), 융모막 추출물(C) 및 이들의 혼합물(AC) 모두 납에 비해 증가된 세포 생존율을 나타내었고, 이에 더하여 납 처리 전의 세포에 비해서도 증가된 생존율을 나타내었다.

[0107] 이를 통해, 각 추출물은 세포독성을 나타내지 않으며, 오히려 세포의 생존을 촉진하는 작용을 하는 것을 알 수 있다.

[0109] 이상과 같이 실시예들이 비록 한정된 실시예와 도면에 의해 설명되었으나, 해당 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 상기의 기재로부터 다양한 수정 및 변형이 가능하다. 예를 들어, 설명된 기술들이 설명된 방법과 다른 순서로 수행되거나, 및/또는 설명된 구성요소들이 설명된 방법과 다른 형태로 결합 또는 조합되거나, 다른 구성요소 또는 균등물에 의하여 대치되거나 치환되더라도 적절한 결과가 달성될 수 있다.

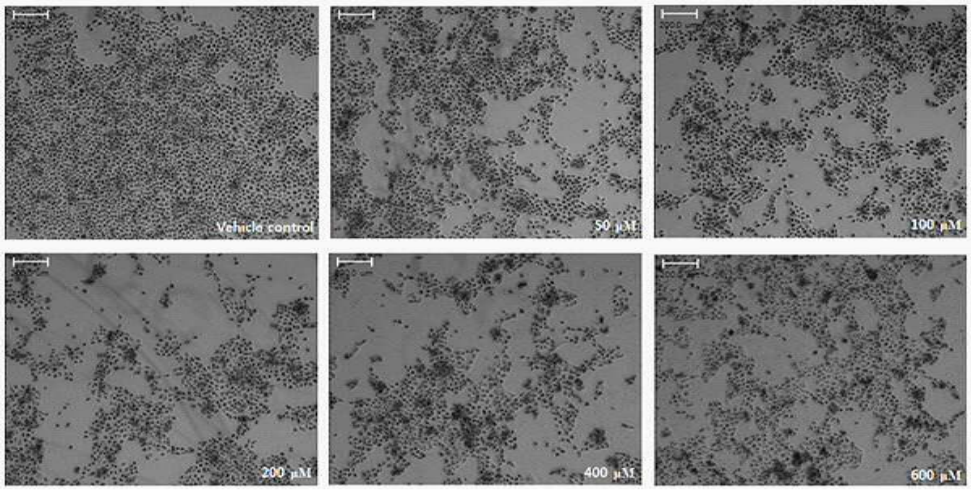
[0110] 그러므로, 다른 구현들, 다른 실시예들 및 특허청구범위와 균등한 것들도 후술하는 특허청구범위의 범위에 속한다.

도면

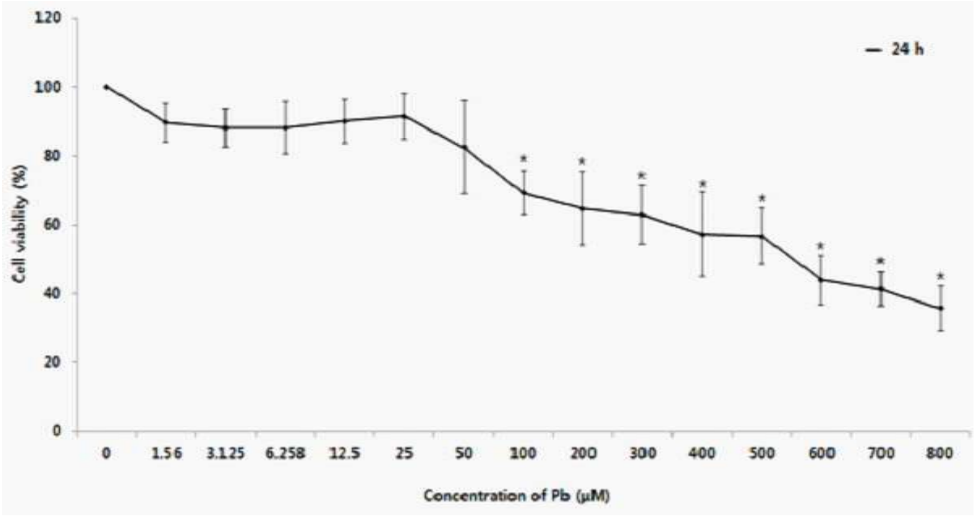
도면1



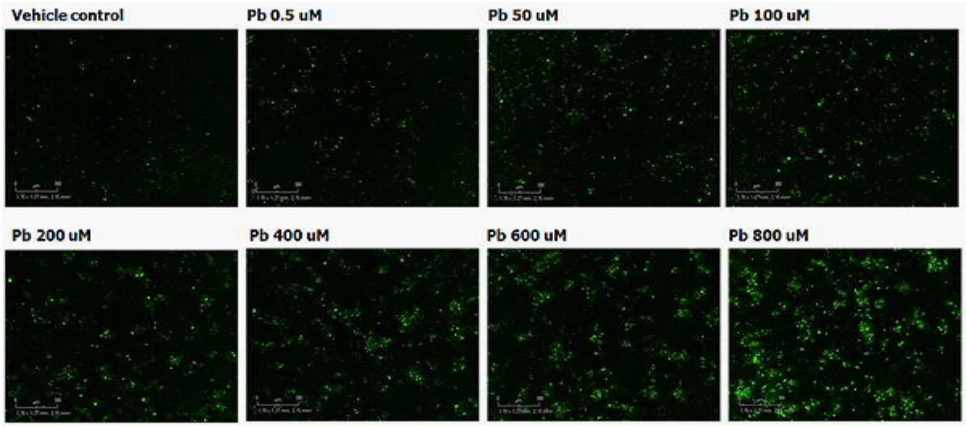
도면2


Vehicle control
50 μM
100 μM
200 μM
400 μM
600 μM

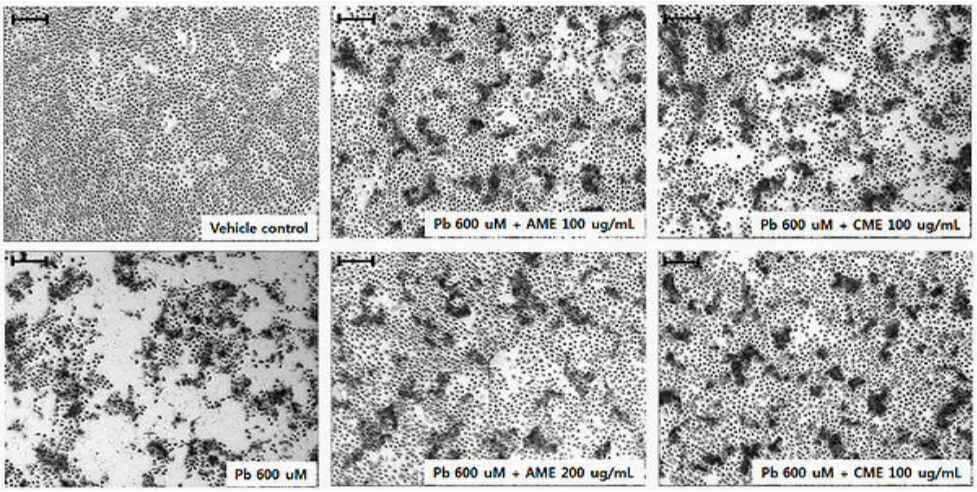
도면3


— 24 h
Cell viability (%)
120
100
80
60
40
20
0
0
1.56
3.125
6.258
12.5
25
50
100
200
300
400
500
600
700
800
Concentration of Pb (μM)

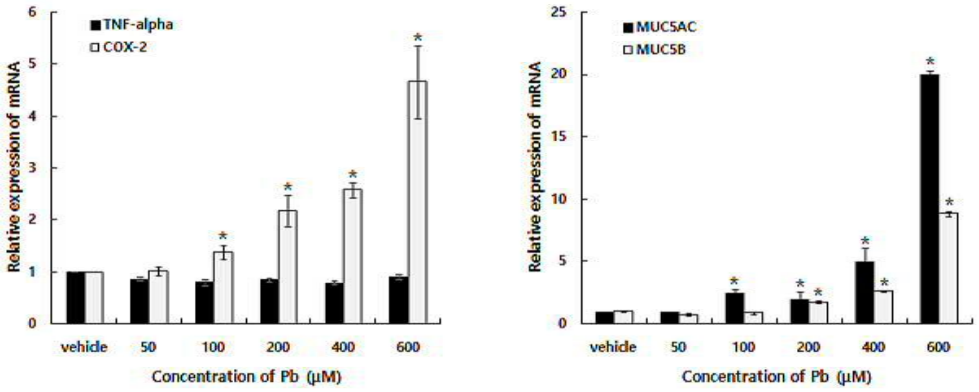
도면4


Vehicle control
Pb 0.5 uM
Pb 50 uM
Pb 100 uM
Pb 200 uM
Pb 400 uM
Pb 600 uM
Pb 800 uM

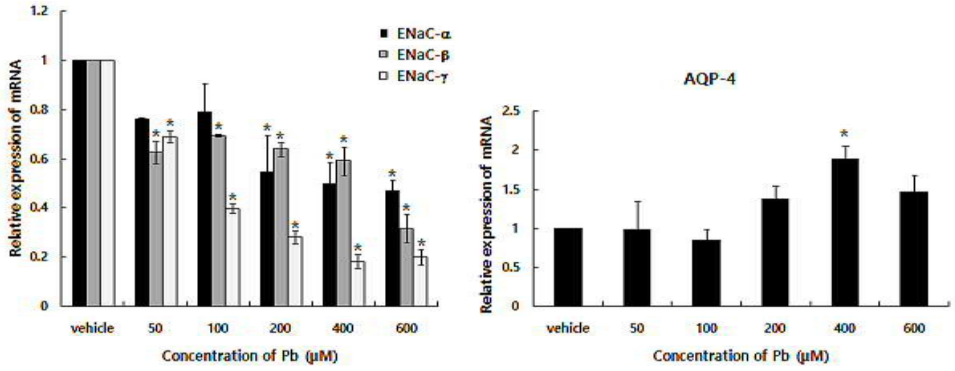
도면5


Vehicle control
Pb 600 uM + AME 100 ug/mL
Pb 600 uM + CME 100 ug/mL
Pb 600 uM
Pb 600 uM + AME 200 ug/mL
Pb 600 uM + CME 100 ug/mL

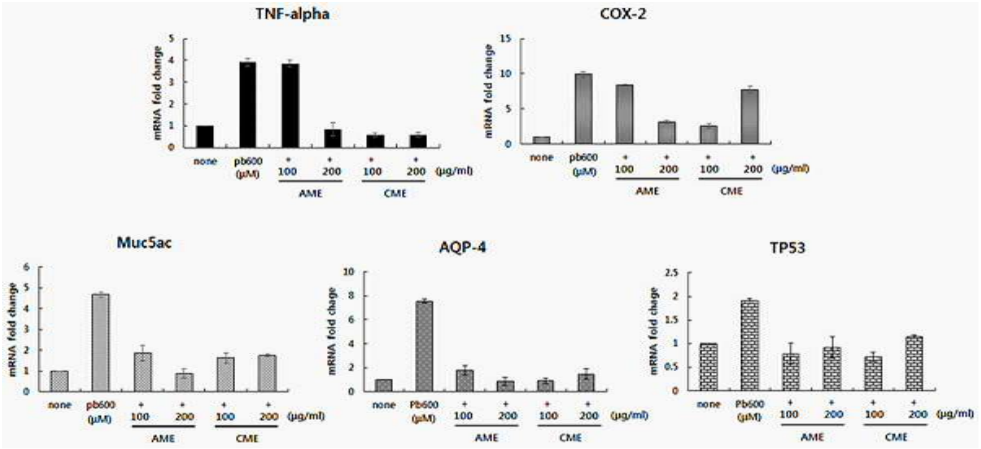
도면6


TNF-alpha
COX-2
Relative expression of mRNA
vehicle
50
100
200
400
600
Concentration of Pb (μM)
MUC5AC
MUC5B
Relative expression of mRNA
vehicle
50
100
200
400
600
Concentration of Pb (μM)

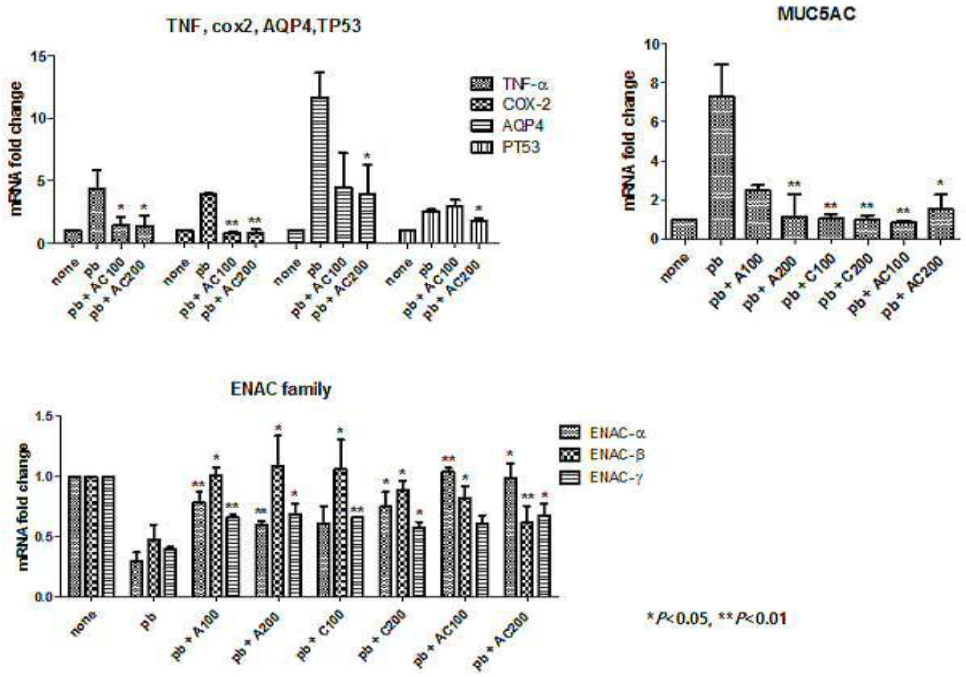
도면7


ENaC-α
ENaC-β
ENaC-γ
Relative expression of mRNA
vehicle
50
100
200
400
600
Concentration of Pb (μM)
AQP-4
Relative expression of mRNA
vehicle
50
100
200
400
600
Concentration of Pb (μM)

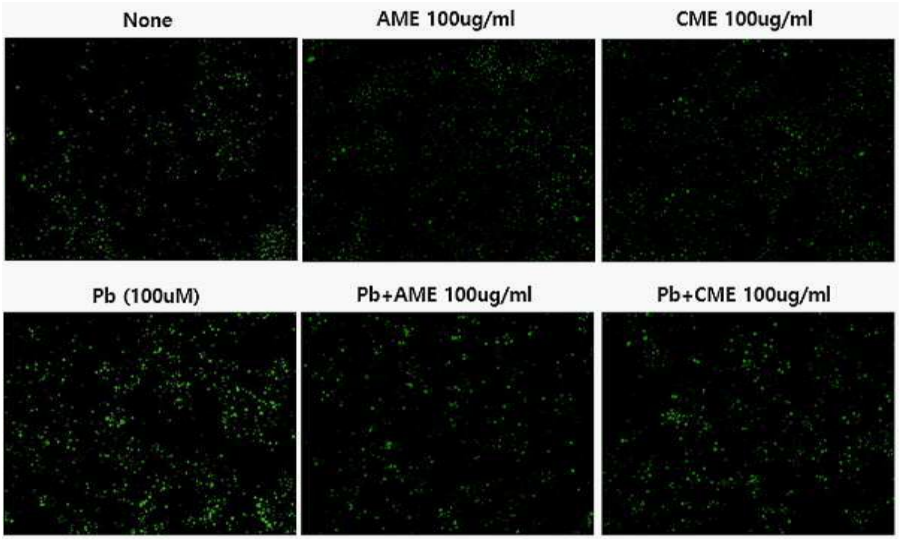
도면8


TNF-alpha
COX-2
Muc5ac
AQP-4
TP53
mRNA fold change
none
pb600 (μM)
100
200
AME
CME
(μg/ml)

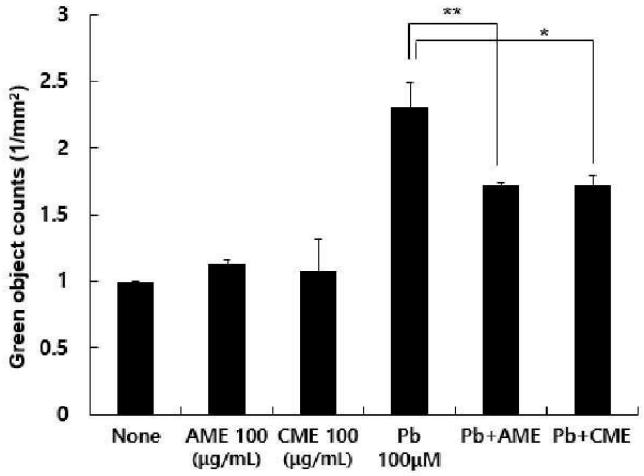
도면9


TNF, cox2, AQP4,TP53
TNF-α
COX-2
AQP4
PT53
mRNA fold change
none
pb
pb + AC100
pb + AC200
MUC5AC
pb + A100
pb + A200
pb + C100
pb + C200
pb + AC100
pb + AC200
ENAC family
ENAC-α
ENAC-β
ENAC-γ
*P<0.05, **P<0.01

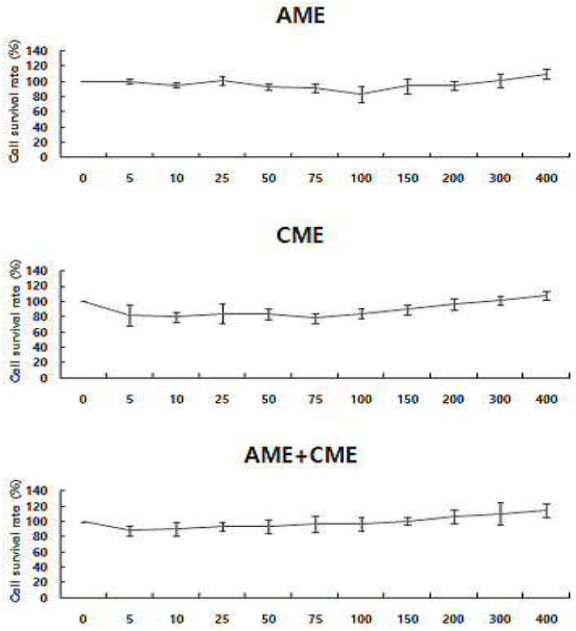
도면10

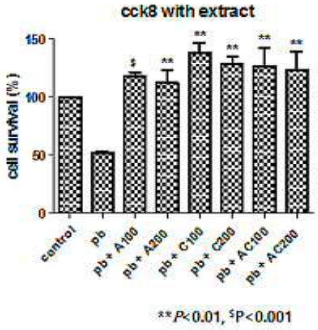

None
AME 100ug/ml
CME 100ug/ml
Pb (100uM)
Pb+AME 100ug/ml
Pb+CME 100ug/ml

도면11


Green object counts (1/mm²)
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
**
*
None
AME 100 (μg/mL)
CME 100 (μg/mL)
Pb 100μM
Pb+AME
Pb+CME

도면12





**P<0.01, $P<0.001